



دانشگاه علوم پزشکی کرمان دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته علوم تشریحی

عنوان:

بررسی تاثیر مینوسایکلین بر پاسخ سلولهای فنوکروموسیتوما (PC12) به
TNF-Alpha در محیط کشت سلولی

توسط: زهرا محمودی

استاد راهنما: دکتر محسن بصیری

استاد مشاور: دکتر سعید اسماعیلی ماهانی

سال تحصیلی: ۱۳۹۱ - ۱۳۹۲

***In vitro* study of Minocycline effect on Pheochromocytoma cell
(PC12) response to TNF alpha**

A Thesis
Presented to
The Graduate Studies

By
Zahra Mahmoudi

In Partial Fulfillment
of the Requirements for the Degree
Master of Science in:

Anatomical Sciences

Kerman university of Medical sciences
February 2013



چکیده:

مقدمه و هدف: مرگ سلولی یکی از عمده ترین عوارضی است که به دنبال بیماریهای نروژنراتیو مختلف نظیر ایسکمی، پارکینسون، الزایمر و غیره رخ میدهد. این مرگ در نتیجه آزاد شدن یکسری فاکتورهای التهابی و توکسیک نظیر $TNF-\alpha$ صورت می پذیرد که مسیرهای مرگ سلولی را فعال می کند.

امروزه اثرات حفاظتی مینو سايکلين در بسياری از مدلهاي *in vitro* و *in vivo* بیماریهای نروژنراتیو گزارش شده است. هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات حفاظتی مینوسايکلين بر مرگ سلولی ایجاد شده توسط $TNF-\alpha$ در سلولهای شبه عصبی PC12 تیمار شده با NGF می باشد.

مواد و روشها: سلولهای PC12 تمایز یافته با NGF مورد استفاده قرار گرفتند. سلولها با غلظت های متفاوت $TNF-\alpha$ (۱۵۰-۱۰ ng/ml) تیمار شدند و غلظت مناسب $TNF-\alpha$ جهت ایجاد مرگ سلولی با استفاده از سنجش MTT پس از ۲۴ ساعت به دست آمد. پس از آن سلولها با دوزهای مختلف مینوسايکلين (۱۰۰-۰/۰۱ μ m) تیمار شدند و اثر این دوزهای دارو بر روی مرگ سلولی ایجاد شده توسط $TNF-\alpha$ و میزان فعالیت Caspase 3، p38 MAPK و p38 MAPK فسفوریله با استفاده از سنجش MTT و آزمایش ایمنوبلات ارزیابی شد.

یافته ها: نتایج ما نشان داد که $TNF-\alpha$ باعث افزایش میزان آسیب سلولی و همچنین فعالیت Caspase 3، p38 MAPK و p38 MAPK فسفوریله گردید که منجر به مرگ سلولی شد. در حالیکه دوزهای ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ و ۱ میکرومول مینوسايکلين توانستند بیان Caspase 3، p38 MAPK و p38 MAPK فسفوریله را مهار کرده و مرگ سلولی را کاهش دهند.

نتیجه گیری: در مجموع داده های ما نشان داد که مینوسايکلين در مرگ سلولی ایجاد شده توسط $TNF-\alpha$ اثرات نروپروتکتیو داشت که این اثرات از طریق مهار مسیرهای سیگنالی وابسته به کاسپاز و نیز غیر وابسته به کاسپاز واسطه گری شدند.

کلمات کلیدی: مینوسايکلين، آپوپتوز، سلولهای PC12، $TNF-\alpha$

Abstract:

Background and Objectives: Cell death is one of the most common side effects in neurodegenerative diseases such as stroke, multiple sclerosis, Parkinson's disease and etc. This occurs due to release of inflammatory and toxic factors like $\text{TNF-}\alpha$ which activates pathways involved in cell death.

Recently, Minocycline has been reported to exert neuroprotective effects over various in vitro and in vivo experimental models of neurodegenerative diseases. Here, we determined protective effects of minocycline on $\text{TNF-}\alpha$ induced apoptosis in differentiated PC12 cells.

Methods: NGF-treated pheochromocytoma (PC12) cells were used. The cells were treated with different concentrations (10- 150 ng/ml) of $\text{TNF-}\alpha$ and appropriate toxic concentration was determined by MTT assay after 24 h. In the next stage, cultured cells were treated with different doses of minocycline (0.01-1000 μM) and the effect of these doses was evaluated on $\text{TNF-}\alpha$ induced cell death and on activation of Caspase 3, p38 MAPK and phosphorylated p38 MAPK which were determined by MTT assay and immunoblotting, respectively.

Results: Our results showed that $\text{TNF-}\alpha$ increases functional cell damage, Caspase-3, p38 MAPK and phosphorylated p38 MAPK activation, leading to cell death. Minocycline in doses of 0.01, 0.1 and 1 μM could inhibit Caspase-3, p38 MAPK and phosphorylated p38 MAPK expression and reduce cell death.

Conclusion: In general, the data show that minocycline had neuroprotective effects in cell death induced by $\text{TNF-}\alpha$. These effects mediated via inhibiting both caspase-dependent and caspase-independent pathways of cell death.

Keywords: minocycline, apoptosis, $\text{TNF-}\alpha$, PC12 cells

